

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ АУТОАНТИТЕЛ-АБЗИМОВ ПРИ ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ

Лухверчик Л.Н., Пивень Н.В., Бураковский А.И.

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», лаборатория медицинского микроанализа, г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Разработаны количественные методы оценки нуклеазной и протеолитической активностей аутоантител и на этой основе проведена оценка каталитической активности антител-абзимов у больных сахарным диабетом 1 типа и аутоиммунным тиреоидитом. Выявлены разнонаправленные изменения двух типов каталитической активности аутоантител различной специфичности: при аутоиммунном тиреоидите – повышение нуклеазной и протеолитической, а при сахарном диабете 1 типа – повышение нуклеазной и снижение протеолитической, что позволило высказать мнение о существовании, как минимум, двух патогенетических механизмов аутоиммунной агрессии при органоспецифической аутоиммунной патологии, связанных как с прямым участием Fab-фрагментов аутоантител в развитии аутоиммунного поражения, так и с общепризнанными механизмами комплементзависимого лизиса, опосредуемого Fc-фрагментами, и деструкцией цитотоксическими T-лимфоцитами клеток-мишеней. Установлено, что каталитические аутоантитела, способные в силу своей уникальной сайтспецифичности оказывать избирательный деструктивный эффект на клетки-мишени, вносят существенный вклад в общий ансамбль антителозависимых механизмов цитотоксичности при аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит, аутоантитела-абзимы, каталитическая активность.

Luchverchyk L.N., Piven N.V., Burakovsky A.I.

PATHOGENETIC ROLE OF ABZYME-TYPE AUTOANTIBODIES IN THE ORGAN-SPECIFIC AUTOIMMUNE PATHOLOGY

Abstract. The work deals with quantitative methods developed for estimation of nuclease and proteolytic activities of autoantibodies. By means of these techniques, appropriate catalytic activities of abzyme-type antibodies were studied in patients with diabetes mellitus type 1, and in subjects with autoimmune thyroiditis. Oppositely directed changes of the mentioned catalytic activities have been found for autoantibodies of different specificity. Autoantibodies occurring in autoimmune thyroiditis showed an increase of both nuclease and proteolytic activities. Meanwhile, the autoantibodies in diabetes mellitus had increased nuclease activity, along with decreased proteolytic activity. These findings are suggestive for existence of two pathogenetic mechanisms in organ-specific autoimmune pathology that are associated either with direct involvement of Fab fragments of auto-antibodies in autoimmune destruction, or with complement-dependent lysis mediated by Fc-fragments and cytotoxic destruction of target cells by cytotoxic T-lymphocytes. The unique site-specific catalytic autoantibodies were established to exert a selective destructive effect upon target cells, thus making a major contribution to the antibody-dependent mechanisms of cytotoxicity in autoimmune diseases. (*Med. Immunol., 2011, vol. 13, N 2-3, pp 145-150*)

Адрес для переписки:

Лухверчик Людмила Николаевна,
Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
Лаборатория медицинского микроанализа
220141, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. Купревича, 5/2.
Тел.: +375 (17) 263-72-73.
Факс: +375 (17) 267-87-61.
E-mail: lexh@tut.by

Keywords: autoimmune disorders, diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, abzyme-type autoantibodies, catalytic activity.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, патология аутоиммунного генеза составляет около трети от общего числа заболеваний в мире и развивается в большинстве случаев у лиц молодого трудоспособного возраста, приводя к ограничению физических возможностей человека, потере трудоспособности и существенным экономическим потерям [22]. Несмотря на достигнутый в последние годы прогресс в понимании основ развития аутоиммунных заболеваний, разработке и внедрении стандартов их диагностики и лечения ключевые механизмы патогенеза этой группы заболеваний до сих пор полностью не изучены [3].

Аутоантитела (АТ) к измененным антигенным компонентам собственных тканей и органов, относящиеся чаще всего к иммуноглобулинам класса G (IgG), играют важную роль при аутоиммунной патологии [2]. В последние годы установлено, что при определенных условиях в молекуле АТ возможно образование каталитического центра. Такие каталитически активные АТ получили название абзимов («abzymes», от англ. – antibody + enzyme). Доказано, что абзимный иммунологический компонент включается в процесс развития аутоиммунного поражения и может иметь самостоятельное патогенетическое значение [21], а абзимы рассматривают как «новый молекулярный инструмент» для изучения патогенеза аутоиммунного поражения [11]. Однако научные исследования, посвященные изучению роли каталитических аутоантител в развитии органоспецифической аутоиммунной патологии, в частности сахарного диабета и аутоиммунного тиреоидита, пока немногочисленны.

Целью данного исследования являлось изучение патогенетической роли аутоантител, обладающих различными типами каталитической (протеолитической и нуклеазной) активности при органоспецифической аутоиммунной патологии – сахарном диабете 1 типа (СД 1) и аутоиммунном тиреоидите (АИТ).

Материалы и методы

Объектом исследования были фракции иммуноглобулинов G (IgG) из сывороток крови от 30 больных СД 1 и 27 пациентов с АИТ, состоящих на диспансерном учете в специализированных эндокринологических отделениях учреждений Минздрава Республики Беларусь, и 15 здоровых доноров (контрольная группа). Для этих целей из предварительно выделенной методом осаждения насыщенным раствором сульфата аммония (Sigma, США) суммарной глобулиновой фракции получали фракции IgG с исполь-

зованием метода анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (Sigma, США) по стандартной методике [15]. Fab- и Fc-фрагменты IgG обследуемых лиц получали при помощи папаина (Sigma, США), а F(ab)₂-фрагменты IgG – пепсина (Sigma, США) по общепринятым методикам [10, 4].

Для количественной оценки нуклеазной (ДНК-азной) активности нами был модифицирован метод [8], основанный на способности 2-этоксиг-6,9-диаминоакридина лактата (риванола) образовывать сгусток с ДНК, величина которого прямо пропорциональна степени деполимеризации ДНК под действием аутоантител-абзимов. Для анализа каждой пробы в пробирке смешивали 200 мкл 0,3% раствора ДНК (Sigma, США) со 100 мкл раствора фракции IgG на физиологическом растворе в концентрации 1 мг/мл и 100 мкл 0,02 М трис-НСl буфера (рН7,4), содержащего 4 mM MgCl₂. В контроле вместо препаратов аутоантител использовали 100 мкл 0,15 М раствора NaCl. Все пробы инкубировали в течение 20 ч при 37 °С, а затем на поверхность каждой пробы наслаивали 20 мкл 0,75% раствора риванола и встряхивали до образования сгустка. Сгусток двукратно отмывали дистиллированной H₂O и растворяли при нагревании в 500 мкл 1n HCl. Спектрофотометрию каждого образца (200 мкл) проводили в планшете для иммуноферментного анализа путем измерения его оптической плотности при длине волны 410 нм. Полученные значения переводили в единицы активности фермента с помощью калибровочного графика (рис. 1), отражающего зависимость оптической плотности от степени деполимеризации ДНК под действием стандартного препарата – фермента ДНКазы.

Оценку протеолитической активности абзимов проводили методом на основе использования хромогенного субстрата натрий-бензоил-DL-аргинин-4(p)-нитроанилида гидрохлорид – БАПНА (Sigma, США), расщепляемого под действием абзимов с последующим образованием 4-нитроанилина [7]. Оптическую плотность конечного продукта определяли на спектрофотометре при длине волны 410 нм.

Для количественной оценки протеолитической активности каждой пробы в лунки планшета для иммуноферментного анализа вносили по 100 мкл раствора препарата аутоантител на физ. растворе в концентрации 1,5 мг/мл и 200 мкл 0,05% раствора БАПНА. В контрольные пробы вместо аутоантител вносили по 100 мкл 0,15 М раствора NaCl. Инкубировали в течение 20 ч при температуре 37 °С, а затем измеряли оптическую плотность каждой пробы при длине волны 410 нм с помощью спектрофотометра. Ве-

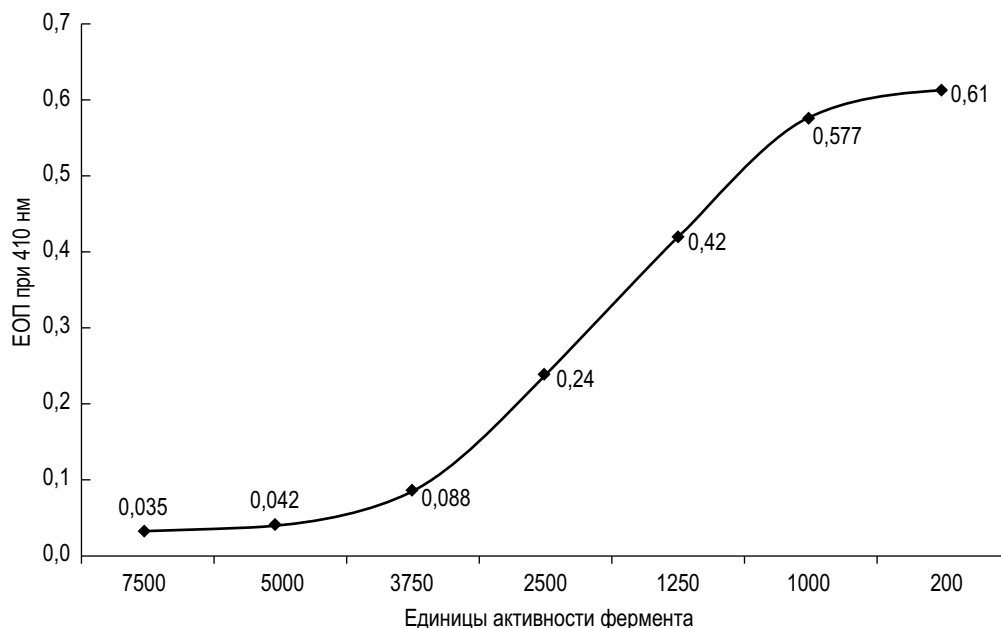


Рисунок 1. Калибровочный график, отражающий зависимость оптической плотности от концентрации стандартного препарата ДНК-азы

личину протеолитической активности (в пикока- талах) рассчитывали по формуле:

$$Y = 20 \times (-0,071 + 4,8 \times X),$$

где Y – величина протеолитической актив- ности в пикокаталах; X – оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Результаты

Проведенная количественная оценка аб- зимной активности IgG-аутоантител у больных СД 1 и АИТ показала, что нуклеазная (ДНК- азная) активность IgG-аутоантител у больных СД 1 составила $2100,0 \pm 98,31$ Е/мл и была в 5,5 раз выше, по сравнению со здоровыми лицами ($380,0 \pm 6,52$ Е/мл). При аутоиммунном тиреоидите она также была повышенной в 5 раз и соста- вила – $1940,0 \pm 75,77$ Е/мл (рис. 2).

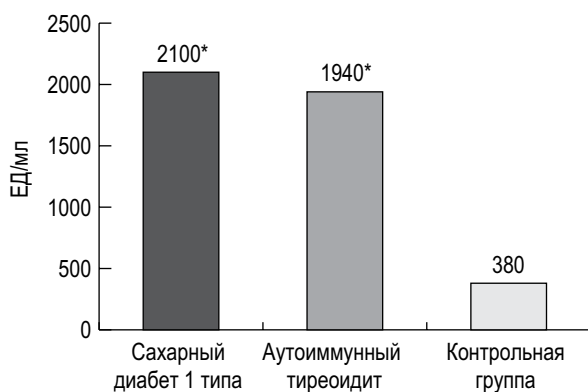


Рисунок 2. ДНК-азная активность аутоантител при СД 1 и АИТ

Иная картина была выявлена при оценке про- теолитической (БАПНА-амидазной) активнос- ти фракций IgG (рис. 3). При АИТ она была в 3,7 раз выше по сравнению с контрольной груп- пой – $104,28 \pm 3,12$ пкат и $27,91 \pm 8,45$ пкат соот- ветственно, в то же время при СД 1 – снижена ($16,85 \pm 1,74$ пкат).

Нуклеазная активность F(ab)₂-фрагментов ($1800,0$ Е/мл) была значительно выше (рис. 4), чем у Fab- ($520,0$ Е/мл) и Fc-фрагментов ($480,0$ Е/мл). Протеолитическая активность F(ab)₂-фрагментов ($15,0$ пкат) также была увели- чена (рис. 5) по сравнению с Fab- ($5,1$ пкат) и Fc-фрагментами ($5,9$ пкат).

Обсуждение

Выявленный характер изменений каталити- ческой активности при АИТ, вероятно, может

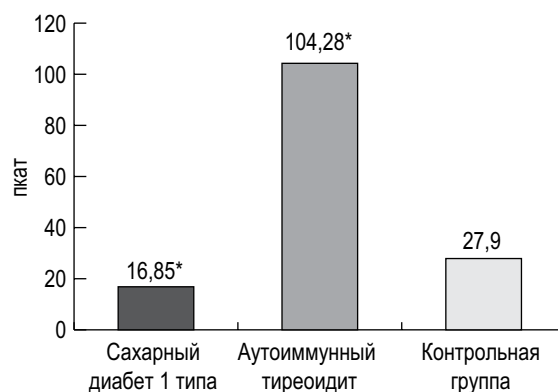


Рисунок 3. Протеолитическая активность аутоантител при СД 1 и АИТ

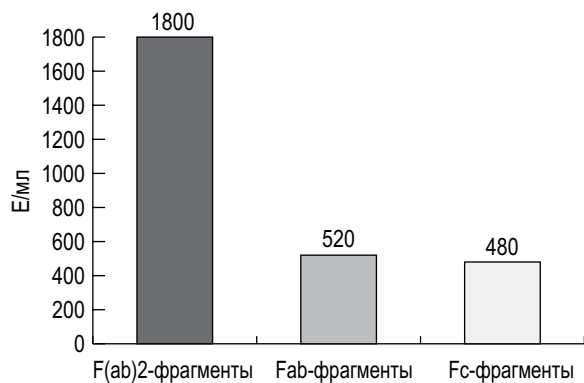


Рисунок 4. ДНК-азная активность фрагментов IgG при СД 1 и АИТ

быть связан с иммунной атакой аутоантител против двух типов аутоантигенов — тиреопероксидазы, внутриклеточного фермента, расположенного на внутренней стороне апикальной части тироцита, и тиреоглобулина — ключевого белка в синтезе тиреоидных гормонов, локализованного внеклеточно — в фолликулах тиреоидной ткани [9]. При СД 1 наличие только ДНК-азной активности аутоантител, возможно, обусловлено внутриклеточной локализацией идентифицированных к настоящему времени аутоантигенов поджелудочной железы [23]. Выявленные различия, оказывающие определенное влияние на степень органических повреждений и клиническую картину изучаемых заболеваний, могут играть важную роль в развитии аутоиммунных процессов.

Обнаруженное рядом авторов появление аутоантител-абзимов у практически здоровых лиц можно рассматривать как ранний предвестник аутоиммунных нарушений, в силу их возможного участия в реализации ряда эффекторных функций, в частности антитело-опосредованного катализа и цитотоксичности путем прямого цитотоксического воздействия ДНК-абзимов на геном клеток-мишеней, либо внося нарушения в изначально сбалансированный уровень физиологического апоптоза [5].

Изученные в ряде экспериментальных работ механизмы генерации каталитической активности антител показали, что в условиях *in vivo* индуктором активности может выступать антиген (АГ), имеющий эпитопы с выраженным зарядом [1]. Такой иммуноген активирует клоны плазматических клеток, синтезирующих антитела-абзимы, несущие в своих активных центрах аминокислотные последовательности с противоположным зарядом [17].

Второй способ генерации каталитических антител *in vivo*, возможно, обусловлен идиотип-антиидиотипическим механизмом. Согласно теории «симметричной идиотип-антиидиотипической сети», антиген-

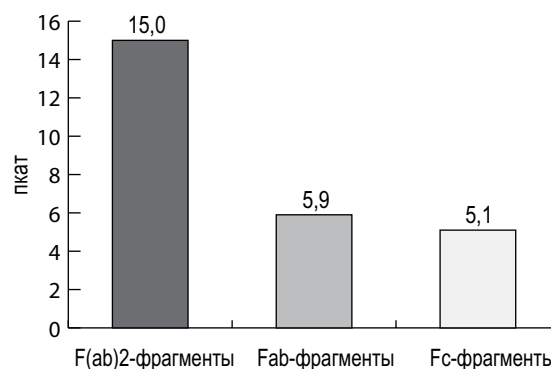


Рисунок 5. Протеолитическая активность фрагментов IgG при СД 1 и АИТ

связывающий сайт (паратоп) антиидиотипического антитела с большой вероятностью может обладать структурным сходством с исходным антигеном, индуцировавшим иммунный ответ [20]. Если в качестве такого антигена выступает активный центр фермента, то антиидиотипические антитела могут обладать белковыми структурами, представляющими собой «внутренний образ активного центра фермента», а, следовательно, и свойствами исходного фермента. Учитывая, что в организме постоянно присутствуют «естественные» антиферментные АТ (в первую очередь против ферментов микробов — антистрептокиназа, антигиалуруонидаза и т.д.), возникающие изменения в идиотипической сети могут приводить к индукции антител, обладающих каталитической активностью [6].

Продолжением исследований по изучению молекулярных основ аутоиммунной агрессии организма при СД 1 была оценка ДНК-азной и БАПНА-амидазной активности фрагментов IgG-аутоантител: Fab-, Fc- и F(ab)₂-фрагментов, полученных при помощи папаина и пепсина соответственно. Обнаруженное нами повышение нуклеазной и протеолитической активностей F(ab)₂-фрагментов аутоантител-абзимов по сравнению с активностью Fab- и Fc-фрагментов возможно связать с различиями в структурных последовательностях этих фрагментов. Поскольку F(ab)₂- и Fab-фрагменты отличаются друг от друга только участком тяжелой цепи в районе талии, включающим последовательность (Cys-Pro-Pro-Pro-Glu-Leu-), специалисты полагают, что именно данный участок тяжелой цепи в районе талии иммуноглобулинов значительно усиливает протеолитическую и нуклеазную активность абзимов [18]. При повреждениях печени, сопровождающих СД 1, количество Fab- или F(ab)₂-фрагментов может существенно возрасти, тогда как у здоровых лиц в кровотоке обнаруживаются лишь их следовые количества [16].

В механизмах реализации физиологических взаимодействий АТ с мишенью важную роль играет их Fc-фрагмент, который обеспечивает активацию комплемента по классическому пути и включение механизмов комплементзависимого лизиса. Известно, что участие Fc-фрагмента является обязательным условием для реализации процессов антителозависимой клеточной цитотоксичности, опосредуемой натуральными киллерами. Fab-фрагменты непосредственного участия в вышеуказанных механизмах цитотоксичности не принимают, что принципиально отличает традиционные механизмы антитело-опосредованной цитотоксичности от механизма цитотоксичности, опосредуемого ДНК-абзимами с прямым участием F(ab)₂ и Fab-фрагментов в реализации каталитической атаки на геном клетки-мишени. На основании вышеизложенного можно предположить существование особого механизма участия каталитических аутоантител в патогенезе аутоиммунных заболеваний — механизме, функционирующем независимо от комплемента и цитотоксических Т-лимфоцитов, но требующем при этом участия F(ab)₂ и Fab-фрагментов АТ. Эти предположения подтверждаются результатами экспериментов по фрагментированию IgG, свидетельствующими, что удаление Fc-фрагментов из раствора не приводит к исчезновению ДНК-азной активности IgG [14].

Установлено, что реализация цитотоксического эффекта ДНК-абзимов, приводящего к гибели ядерной ДНК и клетки-мишени в целом, происходит в несколько стадий: связывание АТ с наружной клеточной мембраной и вовлечении в ранние стадии апоптоза; трансмембранный перенос абзимов и их проникновение в клетку; непосредственное участие ДНК-абзимов в деградации ядерной ДНК и гибели клетки-мишени [12]. Возможно, что в динамике развития цитотоксического эффекта, опосредуемого ДНК-абзимами, существуют два разделенных по времени пика клеточной гибели. Первый пик иллюстрирует активное участие апоптотических механизмов, а второй — механизмов, основным из которых является каталитический гидролиз генетического аппарата клетки-мишени с участием Fab-фрагментов АТ [13].

С учетом вышеизложенного совершенно очевидно, что дальнейшее изучение свойств аутоантител-абзимов позволит прояснить, какой из возможных механизмов гибели клеток доминирует при органных повреждениях, с одной стороны, а с другой — идентифицировать ключевые компоненты путей проникновения АТ в клетку — мишень, завершением которых является деградация хромосомной ДНК.

Полученные нами результаты позволяют говорить о расширении спектра патогенетического действия аутоантител за счет проявления их каталитических свойств, возможно, путем направленной деградации аутоантигенов-мишеней под действием сайтспецифического антителоопосредованного катализа (эффект абзимного киллинга объекта-мишени) при СД 1 и АИТ. Однако патогенетическую роль абзимов в механизмах аутоиммунной агрессии еще предстоит уточнить, так как можно предполагать и существование возможности участия в реализации механизмов цитотоксичности сразу нескольких видов и даже ансамблей абзимов [19]. Многообещающим направлением в практическом использовании абзимов для решения диагностических и терапевтических задач является изучение связи абзимной активности с клиническими проявлениями аутоиммунных заболеваний.

Проведенные нами исследования и полученные новые результаты позволяют сформулировать следующие выводы. Обнаружено повышение ДНК-азной и снижение БАПНА-амидазной активностей аутоантител у больных СД 1 и повышение двух типов каталитической активности (БАПНА-амидазной и ДНК-азной) аутоантител у больных АИТ. Выявленные разнонаправленные изменения двух типов каталитической активности доказывают их участие в механизмах развития этих форм патологии и, возможно, с одной стороны, отражают степень выраженности аутоиммунных нарушений в организме, а с другой — позволяют высказать мнение о существовании, как минимум, двух патогенетических механизмов аутоиммунной агрессии как при СД 1, так и при АИТ. Один из них связан с прямым участием Fab-фрагментов АТ в развитии аутоиммунного поражения, а второй — с общепризнанными механизмами комплементзависимого лизиса с участием Fc-фрагментов и деструкцией цитотоксическими Т-лимфоцитами клеток-мишеней.

Таким образом, каталитические аутоантитела, в том числе ДНК-абзимы и БАПНА-абзимы, способные в силу своей уникальной сайтспецифичности оказывать избирательный деструктивный эффект на клетки-мишени, вносят существенный вклад в общий ансамбль антителозависимых механизмов цитотоксичности при аутоиммунной патологии.

Список литературы

1. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность IgG у больных с аутоиммунной патологией // Иммунология. — 1998. — № 3. — С. 54-56.

2. Клетки иммунной системы / Под ред. И.С. Фрейдлин и А.А. Тотолян. – СПб.: Наука, 2001. – 272 с.
3. Мальцев К.А., Хитров А.Н., Введенская О.Ю., Пономаренко Н.А., Исаева М.А., Кинова М.В., Третьяк Е.Б., Шогенов З.С., Алекберова З.С., Габибов А.Г., Сучков С.В. Каталитические аутоантитела – новый молекулярный инструмент в кардиологии и офтальмологии // Терапевтический архив. – 2006. – № 11. – С. 70-76.
4. Методы исследований в иммунологии / Под ред. И. Лефковитса и Б. Пернуса. – М.: Мир, 1981. – 485 с.
5. Невинский Г.А., Канышова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела в норме и при патологии // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 11. – С. 245-552.
6. Одинцова Е.С. ДНК-гидролизующие IgG антитела из сывороток крови больных бактериальными инфекционными заболеваниями // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2006. – № 2. – С. 23-31.
7. Определение БАПНА-амидазной активности IgG: инструкция по применению: учеб.-метод. пособие / Под ред. И.И. Генералова. Определение ДНК-азной активности IgG: инструкция по применению: учеб.-метод. пособие / Под ред. И.И. Генералова. – Витебск: Витебск. гос. мед. ун-т, 2000. – 8 с.
8. Определение ДНК-азной активности IgG: инструкция по применению: учеб.-метод. пособие / Под ред. И.И. Генералова. – Витебск: Витебск. гос. мед. ун-т, 2000. – 13 с.
9. Пивень Н.В., Лухверчик Л.Н., Мохорт Т.В., Кузьменкова Е.И., Денисевич Н.П. Донозологический скрининг и мониторинг – основа профилактики заболеваний щитовидной железы // Наука и инновации. – 2007. – № 4 (50). – С. 32-38.
10. Практикум по иммунологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. И.А. Кондратьевой и А.А. Ярилина – М.: Изд. центр «Академия», 2004. – 272 с.
11. Сучков С.В., Введенская О.Ю., Вострикова И.А. Антителоопосредованный протеолиз ассоциированных с миелоном белков как новый механизм контроля за процессами демиелинизации при рассеянном склерозе // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2007. – № 7. – С. 32-36.
12. Сучков С.В., Габибов А.Г., Гунчев Н.В. ДНК-абзимы и механизмы цитотоксичности при СКВ // Иммунология. – 2001. – № 4. – С. 47-51.
13. Сучков С.В., Габибов А.Г., Гунчев Н.В. Феномен кросс-реактивности ДНК-абзимов и его значение для механизмов цитотоксичности и апоптоза // Онтогенез. – 2001. – Т. 32, № 5. – С. 348-352.
14. Сучков С.В., Наумова Т.Е., Хитров А.Н., Агеев В.А., Огнева Е.А., Алекберова З.С., Дурова О.М., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Новые механизмы антителоопосредованной цитотоксичности и их возможная роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний // Мол. Медицина. – 2005. – № 1. – С. 32-36.
15. Хроматография в медицине и биологии: учеб.-метод. пособие / Под ред. Буланова А.В. – Самара: Самарск. гос. мед. ун-т, 2006. – 116 с.
16. Blackhum G.M., Datia A., Denham H., Wentworth P. Catalytic Antibodies // Adv. Phys. Org. Chem. – 1998. – Vol. 31. – P. 249-392.
17. Faaber P., Capel P.G.A., Rijke G.P.M. Crossreactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans / P. Faaber // Clin. Exp. Immunol. – 1999. – Vol. 55. – P. 48-57.
18. Fukuzawa K., Kitaura K., Uebayasi M., Nakata K., Kaminuma T., Nakano T. Ab initio quantum mechanical study of the binding energies of human estrogen receptor alpha with its ligands: an application of fragment molecular orbital method // J. Comput. Chem. – 2005. – Vol. 15. – P. 1-10.
19. Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., Paltsev M.A., Suchkov S.V. Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // Autoimmun. Rev. – 2006. – N 5. – P. 324-330.
20. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system // Ann. Immunol. – Paris, 1998. – 389 p.
21. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Peculiarities of abzymes from sera and milk of healthy donors and patients with autoimmune and viral diseases // Biochemistry (Moscow). – 2009. – Vol. 74, N 9. – P. 945-61.
22. Principles and methods for assessing autoimmunity associated with exposure to chemicals: Environmental health criteria – 236. – WHO Press, 2006. – 359 p.
23. Wasserfall C.H., Atkinson M.A. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes Autoimmun Rev. – 2006. – Jul; 5 (6). – P. 424-428.

поступила в редакцию 04.02.2011
отправлена на доработку 13.02.2011
принята к печати 15.02.2011